

栄養源としての酵母に関する遺伝学的研究

(第 5 報)

Kluyveromyces fragilis の扁平培養コロニーの形態遺伝について

笠原秀夫 衣鳩文恵

Genetic Studies on the Supply of Nutrition by Yeasts

Part V

Morphological inheritance of the small colonies of *Kluyveromyces fragilis*

Hideo Kasahara and Fumie Ibato

緒言 前報⁴⁾に於て、乳糖酸酵性酵母 (*K. fragilis*) からセミ呼吸欠損変異株が 4 ニトロキノリンオキサイドを用いた場合に、0.8 ~ 0.1r/ml の濃度で BURKHOLDER 寒天培地上で出現したが、そしてそのコロニーの形は円形で親株のコロニーは星形であった。然しその後親株中に何等呼吸欠損変異誘発剤を用いなくても、このような変異した円形コロニーの細胞が自然に Burkholder 寒天培地上で発生することが判った。しかもその株は呼吸能は正常であるので、この呼吸能正常な形態変異株は親株及び先のセミ呼吸欠損変異株との間に如何なる点で異なるのか遺伝学的に追求するのが今回の目的である。

実験方法

1. 供試酵母

協会 7 号酵母 (*S. cerevisiae*) 7 N: 財団法人日本醸造協会が頒布している代表的清酒酵母。

K. fragilis (F3-5): 財団法人醸酵研究所から分与された乳糖酸酵性酵母。

K. fragilis FQ: F3-5 を 4 ニトロキノリンオキサイド処理に依って得られたるセミ呼吸

欠損変異株。

S. carlsbergensis Br 1: 下面酸酵ビール酵母

S. cerevisiae S 144: 上面酸酵ビール酵母

以上のビール酵母は何れも西独ミュンヘン醸造試験所から供与された。

2. 麦芽汁の調製法

粉碎麦芽 1 kg に 3 倍量の水を加え、攪拌し乍ら加温して 45°C 1 時間、65°C 2 時間、最後に 75°C 30 分を要して糖化を行ない、濾紙で濾化して濾液に、1 l に 1 個の割合で卵白を加え、泡が立たなくなるまで煮沸して清澄にし、再び濾紙で濾過したる後、糖度を 17°Bllg に調製する。

3. Burkholder らの培地²⁾ (B 培地)

glucose	20.0g
asparagine	2.0
KH ₂ PO ₄	1.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2.0
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.5
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.33
KI	0.1mg
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.25
NnSO ₄ · 4H ₂ O	0.04

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.02
H_3BO_3	0.60
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.04
thiamine HCl	0.31
inositol	0.20
ca-pantothenate	10.00
pyridoxine HCl	0.20
p-aminobenzoic acid	0.05
nicotinic acid	0.20
biotin	2.0r

蒸留水を加えて1000ml とする, 固体培地とするときには寒天20g を加える。

4. Ogur の簡易試験法

呼吸能有無の判定に Ogur⁵⁾ の alkali production method も採用した。この方法は次の如き組成の培地を作り, その 5 ml を内径17mm, 高さ5cm 長さ15cm の L 型試験管に入れ, 加圧滅菌したものに, 予め斜面培養してある供試酵母の 1 rich loop を接種し, 30°C で試験管の長さの方向に振盪 (振幅17 cm, 120r・p・m) し乍ら培養すると, 呼吸能のあるものは 5 日以内に赤色に変わるというのである。

Respiration test medium

glucose	0.2g
KH_2PO_4	0.05g
peptone	0.2g
Na-acetate	0.4g
yeast extract	0.01g
metal solution	0.1g
0.1%phenol red	3g
H_2O	100ml
pH	6.5
metal solution	
$\text{MnSO}_4 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	2.27mg
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.883mg
$\text{CaSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.253mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	199mg
H_2O	100ml

5. 孢子形成試験

供試験酵母を 1 白金耳試験管内の 17°Bllg 麦芽汁10ml に接種, 30°C, 48時間培養し, 上

澄液を傾斜して排除し, 沈澱酵母に滅菌水10 ml を加えかくはん洗條後遠沈管に移し, 遠心分離機にかけ, 管底の酵母を滅菌ピペットで吸い取り, 試験管内の孢子形成培地 (0.4% 酢酸曹達寒天斜面) に塗布する, これを 30°C で 48時間保存して孢子の形成を待つ。RD 酵母は孢子を形成しない。

6. 糖の醗酵性試験

各種糖類に対する醗酵試験をペプトン 1 % 酵母エキス (粉末) 0.5% これに目的の一つの糖を 2 % 含ませたものを試験培地 (3 ml) として Durham tube を用いて行なった。即ち一つの試験管内に逆さに入れてある細試験管がその糖で充たされていて, この親試験管に酵母を接種し, 若し目的の糖を醗酵すれば逆試験管にガスの気泡が貯留することにより醗酵性の有無を判定できる。

7. 酵母の醗酵能呼吸能測定

ワールブルグ検圧計⁶⁾ を使用し, 酵母の浮遊液を用いて呼吸による吸収及び CO_2 放出を測定した。その方法を示すと, 麦芽汁寒天斜面 (10ml) に 30°C 48時間前培養した菌苔を 0.9% の生理食塩水で集菌し, 3 回遠心分離し乍ら洗滌したものを 10ml メスコルベンに入れ定容としたる浮遊液を試料とした。

マノメーターの容器別組成は表 1 の通りである。

表 1 マノメーター容器別組成

容 器	A	B	C	D
主室 { 菌 浮 遊 液	0.5ml	0.5ml	0.5ml	
M / 15 リン酸緩衝液 pH5.29	0.5	0.5	0.5	
H_2O	0.5		0.5	2.0ml
側室 M / 10 ブドウ糖	0.5	0.5		
副室 15% KOH		0.5	0.5	

次に各容器をそれぞれ対応するマノメーターと気密に連結して, 30°C の恒温槽に入れ, 約 10 分振盪して温度平衡に達した時点から測定を開始し, 10 分毎に各マノメーターの目盛を記録し 1 時間で測定を終る。

試料の採取量は, 使用した菌浮遊液の残液から 5 ml 秤量管に採り, 105°C で乾燥して,

その1/10に相当する。

呼吸速度を反応容器に入れた試料の量で割ったものがその試料の呼吸能で、次のように表示される。

Q_{O_2} = 吸収した O_2 の量 (μl) / hr / mg (乾物酵母量) なお、この場合の排出 CO_2 の量は次の通りである。

Q_{CO_2} = 排出した Q_{CO_2} の量 (μl) / hr / mg (乾物酵母量)

RQ (呼吸商) の表示は同一試料の Q_{O_2} で Q_{CO_2} を除した商である。

醗酵による CO_2 の放出を測定するには、容器中の気相を N_2 で置換する必要がある。

置換の方法としては、真空置換の方法を採用した。

N_2 ガス気相中での CO_2 発生量の測定結果は、次のように表示される。

$Q_{CO_2}^{N_2}$ = 発生した CO_2 の量 (μl) / hr / mg (乾物酵母量)

8. 単一細胞分離

培地中の供試酵母をマイクロマニプレーター (顕微解剖機) を用いて顕微鏡下で微動の遠隔操作により新しい培地の小滴中に導入するが、その順序は解剖架台 (図1) 上のカバーガラスの下面に供試菌液の小滴 S と新しい培地 N (麦芽汁17°Bllg) の小滴を並べて点滴しマイクロマニプレーターに付属のガラス針を図1の如く挿入して顕微鏡下で S 滴から N 滴に1ケの細胞を選んで運ぶ、次にこのカバーガラスを Böttcher 湿室 (図2) のガラスリン

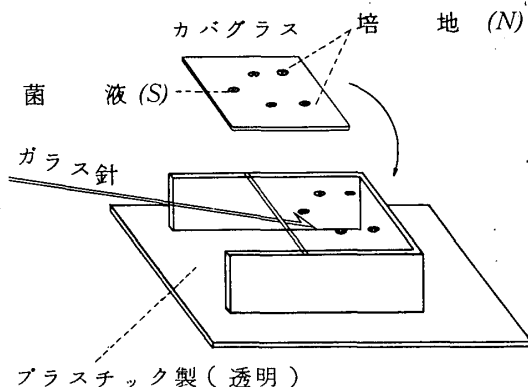


図1 解剖架台と試料と解剖針の配置

グの上に被せ中に少量の水滴を入れて上下をワセリンで封じて恒温器に入れる。その後所定の温度で培養する。

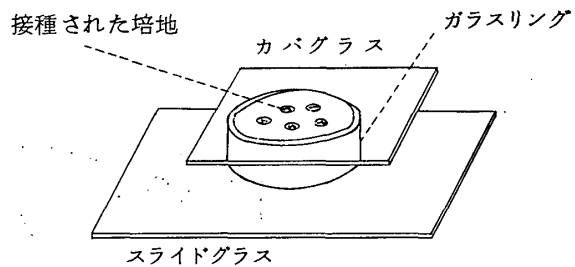


図2 Böttcher型湿室

実験結果と考察

1. *K. fragilis*(F3-5) 培養中に出現する変形コロニーの継代培養

Burkholderの寒天培地をシャーレに流し込み固めた表面に、麦芽斜面培養30°C48時間目のF3-5菌を白金線の尖端で微量採取し、それを試験管内の無菌水10mlに接種攪拌し、それを更に別の無菌水10mlに1mlの滅菌ピペットで0.5ml注入混和したものを均一に塗布¹⁾する。これを30°Cの恒温器内に保って10日后に観察した。その場合の出現コロニーの状態は殆んど凡て星形で周縁にギザギザが見えるが、稀にその周縁が大凡そ円滑のものが現われた。この様な円形のコロニーは前報⁴⁾でF3-5菌の呼吸欠損変異株を作出する目的で4・ニトロキノリンオキサイドで処理した際に呼吸欠損(RD)ではなかったがセミRDとして得られた酵母のコロニーに見られた形状に似ている。そこで正常の星形コロニーの菌をB(準親株)とし、自然に現われた円形コロニーの菌をA(自然変異株)として図3に示す如き順序で継代固体培養を行ない、星形コロニー菌と円形コロニー菌の純度(出現頻度)を調べた。その結果は図3のA或はBの脇に示す如くである。

即ち星形の子孫から星形と円形が現われ、それぞれの典型的星形コロニー1ケ及び円形コロニー1ケの次代細胞のコロニー群中にそ

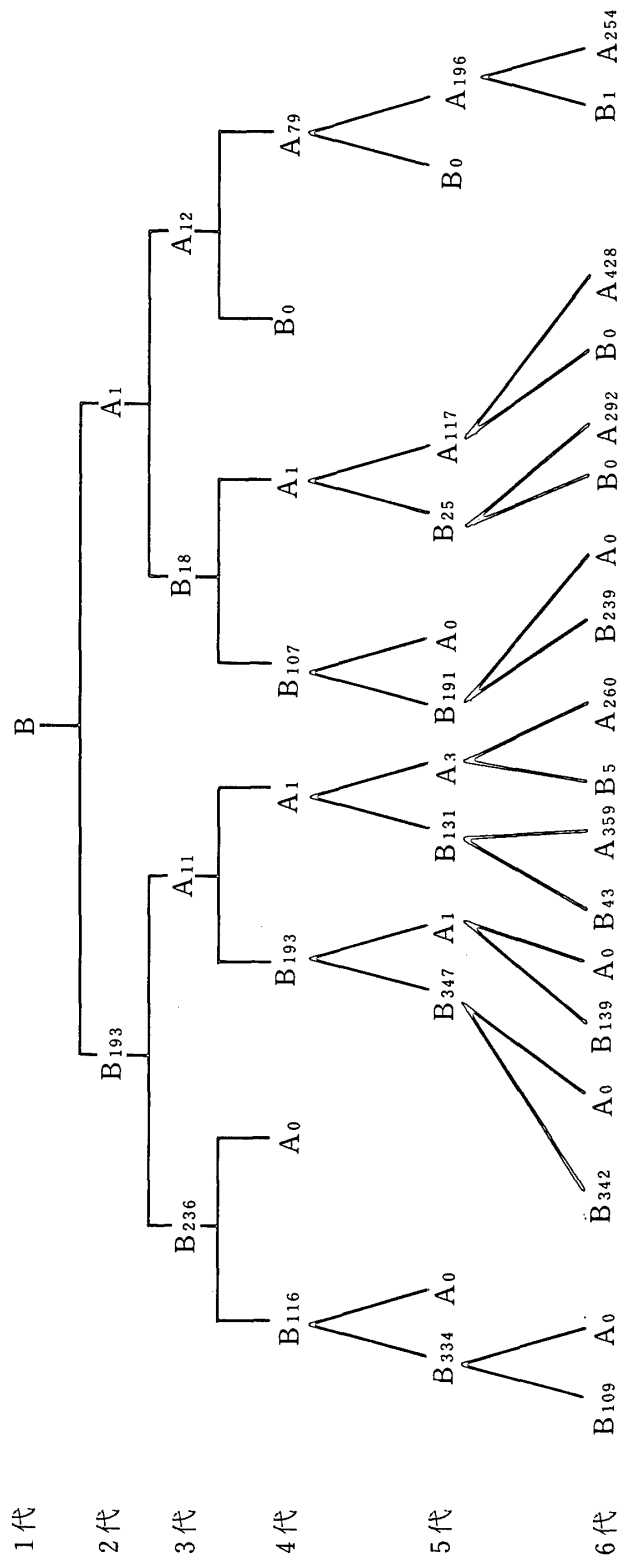


図3 *K. fragilis* の単一細胞コロニーの円形と星形別継代培養出現比

注 { A 円形コロニー
B 星形コロニー
数字は出現したコロニーの数

れぞれに又星形と円形が出現している。唯その出現比率は星形の系統からは星形が圧倒的に多く、円形の系統からは円形が大勢を占めていることが判った。但し5代目の星形151とか6代目の星形139円形359円形292のような不肖の子が多く現われる場合もある。然しこれらの先々代を見れば隔代的遺伝と言えるかも知れない。

この不定性を究明するには星形酵母と円形酵母との交配種を作り、星形と円形の何れが優性であるのか、またそれに関与する遺伝子を探すのが最適であるが、F3-5はホモタリクであるため半数体を得られないのが弱点である。然し核性遺伝ではなく細胞質遺伝ではないかと思われる。なお、前報⁴⁾に於て得られたセミRD株(FQ)は何代移植しても完全な円形コロニーのみであった。

これは呼吸欠損変異誘起剤として使用した4NQOが星形成遺伝子に働いて変異を起し、円形コロニーのみが現われる変異を生じたのである。

2. *K. fragilis* 系酵母と協会7号酵母及びビール酵母間の細胞の増殖形態比較

供試酵母として次の酵母を用いた。

K. fragilis 系としては次の菌株を選んだ。

- ・親株 (*K. fragilis*) 符号 F
- ・準親株 (星形334ケ中の1代表株)
符号 1 AA
- ・自然変異株 (円形196ケ中の1代表株)
符号 4 BB
- ・セミRD株 (FQ)
その他の系統として
- ・協会7号酵母 7 N
- ・同上 RD株 7 NQ₁
- ・下面ビール酵母 Br₁
- ・上面ビール酵母 S144

以上の菌株を夫々麦芽汁(4°Bllg)で培養したものを試料としてマイクロマニプレーターを使用して単細胞分離を行ない16°C24時間後の初期増殖状態及び48時間後の終期の細胞群の周縁の一部を顕微鏡で観察撮影比較した。

その結果は図4(1~2)の通りである。

図4によると初期増殖状態が終期の細胞群の周縁模様を特徴づけているのはF3-5と4BBとS144でF3-5と4BBでは固体培地周縁の星形(図5)と関係があるようである。然しS144のように固体培地では元来周縁のスムーズなものもある、このようなものは細胞の結節が固体培地では密着して了うのであろう。S144, 7N, 7NQ, 及びBr₁の単一細胞コロニーは何れもFQの型(図5)であった。

3. 細胞の増殖形態と生長力の強弱

培地はB培地を用い、その10ml宛を試験管に入れ、滅菌後各試験管別に供試酵母(麦汁寒天斜面に30°C培養48時間目のもの)1白金耳(乾物として1mg相当)を接種して30°Cで72時間培養した(途中24時間目と48時間目に試験管を振盪して沈澱酵母を均一に浮遊させた)。その後これを水洗し乍ら遠心分離(3000r・p・m)して沈澱酵母を集め秤量管に採り105°Cで乾燥して乾物量を求めた。なお、酵母分離後の廃液の糖分(直接還元糖)をベルトラン氏法で定量した。その結果は表2に示す。

次に表2について収量をみると、*K. fragilis*の親株F3-5(星形)を100とした場合準親株4BB(星形)はこれと同等であるが自然変異株1AA(円形)は68で可成り劣る、FQ(セミRD)は48で更に低下している。即ち星形コロニーは円形コロニーよりも*K. fragilis*に関する限り生長力は優れている。

次に協会7号酵母(親株)と比較すると7NはF3-5の3倍にも達している。そのRD株(7NQ₁)は7Nの83.6%位であるが、それでもF3-5の2.7倍にも及んでいる。

ビール酵母は下面醗酵でも上面醗酵でも7Nには及ばないが、F3-5の2.5倍以上である。

即ち協会酵母もビール酵母も単一コロニーはFQの如く円形であるが収量がF3-5(星形コロニー)に劣るわけではない、むしろ優れている。

の酵母の絶対収量が非常に少いことである。

表2 酵母の変異と成長力

供 試 酵 母		収量 mg	収量 比	残糖 %	対消費糖 収 率
<i>K. fragilis</i>	F3-5 親株	4.7	100	53.4	5.04
	1AA 自然変異株	3.2	68	65.6	4.65
	4BB 準親株	4.7	101	45.6	4.32
	FQ セミ RD	2.3	48	68.9	3.70
協会7号	7N 親株	15.0	323	0	7.5
	7NQ ₁ RD	12.6	270	0	6.3
ビール酵母	Br1 下面発酵	12.5	269	0	6.25
	S144 上面発酵	12.6	270	0	6.3

そこで対消費糖収率を求めてみたのが表2の右端に出ている。これによると糖の資化率では *K. fragilis* 系は協会7号及びビール酵母に比べて劣るには違いないが対全糖収量比程悪くはない。これは醗酵能が弱いばかりでなく、B培地の組成が *K. fragilis* の生長には不適当なのかも知れない。

4. 細胞の増殖形態と醗酵能呼吸能との関係

K. fragilis の親株(細胞は楕円形、コロニーは星形)から得られた準親株(細胞は長伸形、コロニーは星形)と自然変異株(細胞は楕円形、コロニーは不定円形)及びセミ RD 株(細胞は楕円形、コロニーは定円形)間にその醗酵能呼吸能或は RD に相違があるか否かを他の協会酵母及びビール酵母と共に比較した。その結果は表3の通りである。

Q₀₂ では F3-5 が最高で8.01準親株は1.39で最低である、これに対して Q_{CO₂} はセミ RD が8.82で最高であり、不定円形の自然変異株は2.68で最低である、RQ は親株と自然変異株が1.0以下で強く、これに対し準親株とセミ RD とはやや高く2.35と2.06である。総合的にみるとセミ RD は RQ が高く Q_{CO₂} も Q_{N₂O₂} も高くやはりセミ RD に相応しい。自然変異株は RQ は最も低く産膜酵母のような長伸細胞にあり勝ちな傾向である。

協会7号酵母は親株は RQ2.8で、Q_{CO₂} も Q_{N₂O₂} も高く醸造用酵母として理想的である、その RD 株の 7 NQ₁ は Q_{N₂O₂} が21.22で非常

に高く特徴が良く現われている、ビール酵母の方は RQ は Br 1 が3.51で S144は2.21で上面酵母の方がやはり少し低い。

5. 細胞の増殖形態と単一コロニーの様態

図5の左側は *K. fragilis* 系酵母を B 培地寒天上に分散培養して30°C10日目のものを撮影したもので、右側は左側の一つのコロニー像を顕微鏡下で拡大撮影したものである。

親株 (F3-5) は大きな星形にみえ、準親株 (4 BB) は星形ではあるが全般に小型である。然しその細胞は長伸形である。自然変異株 (1 AA) はそのコロニーの周辺が星形ではないが不定形の円をなしている。セミ RD 株 (FQ) は 4 NQO 処理によって得られた完全な定円形コロニーでセミ呼吸欠損株である。

4 BB と 1 AA は図3に示すように親株から星形コロニー或は不定円形コロニーを継代培養して得られたもので、4BB は B₁₀₉ と A₀ の親株で、B₃₃₄ の中の代表であり、1AA は B₁ と A₂₅₄ の親株で、A₁₉₆ の中の代表である。

6. 供試酵母の糖醗酵性の比較

K. fragilis の親株、自然変異株、準親株及びセミ RD 株その他の協会酵母ビール酵母について糖醗酵性を調べた結果は表4の通りである。

この表から判ることは準親株、自然変異株及びセミ RD 株の何れも乳糖及びイヌリンを醗酵し親株 (F3-5) と変りがない。これに対

して協会酵母は7 N も7 NQ₁ も乳糖及びイヌリンは醗酵しないがマルトースを醗酵している。またビール酵母は上面下面を問わずメリピオースを醗酵しているのが大きな特徴で

ある。

7. *K. fragilis* 系酵母の好氣的諸性能比較

親株, 自然変異株, 準親株及びセミRD 株の好氣的諸性能を纏めると表5の通りである。

表3 酵母の変異と醗酵能呼吸能の関係 能

供 試 酵 母		Q _{O₂}	Q _{CO₂}	RQ	Q _{CO₂} ^{N₂}
<i>K. fragilis</i>	F3-5 親株	8.01	7.54	0.94	4.84
	1AA 自然変異株	4.93	2.68	0.54	8.6
	4BB 準親株	1.39	3.26	2.35	6.06
	FQ セミ RD	4.29	8.82	2.06	8.86
協会7号	7N 親株	4.86	13.7	2.8	12.77
	7NQ ₁ RD	—	—	—	21.22
ビール酵母	Br1 下面	5.47	19.2	3.51	12.3
	S144 上面	3.0	6.62	2.21	18.35

表4 供試酵母の糖の醗酵性

種別	糖類									
		Gl	Fr	Ma	Su	La	Ga	Tr	Me	In
<i>K. fragilis</i>	F3-5	+	+	—	+	+	+	—	—	+
	1AA	+	+	—	+	+	+	—	—	+
	4BB	+	+	—	+	+	+	—	—	+
	FQ	+	+	—	+	+	+	—	—	+
協会7号	7N	+	+	+	+	—	+	—	—	—
	7NQ ₁	+	+	+	+	—	+	+	—	—
ビール酵母	Br1	+	+	+	+	—	+	—	+	—
	S144	+	+	+	+	—	+	—	+	—

Ma=maltose Me=melibiose Tr=trehalose Su=sucrose
Fr=fructose Ga=galactose In=inulin Gl=glucose
La=Lactose

表5 *K. fragilis* 系酵母の好氣的反応

種別	項目			
		麦汁培養で皮膜形成	Qgur の反応	胞子形成
F3-5	親株	+	red	+
1AA	自然変異	+	red	+
4BB	準親株	+	red	+
FQ	セミ RD	+	red	+

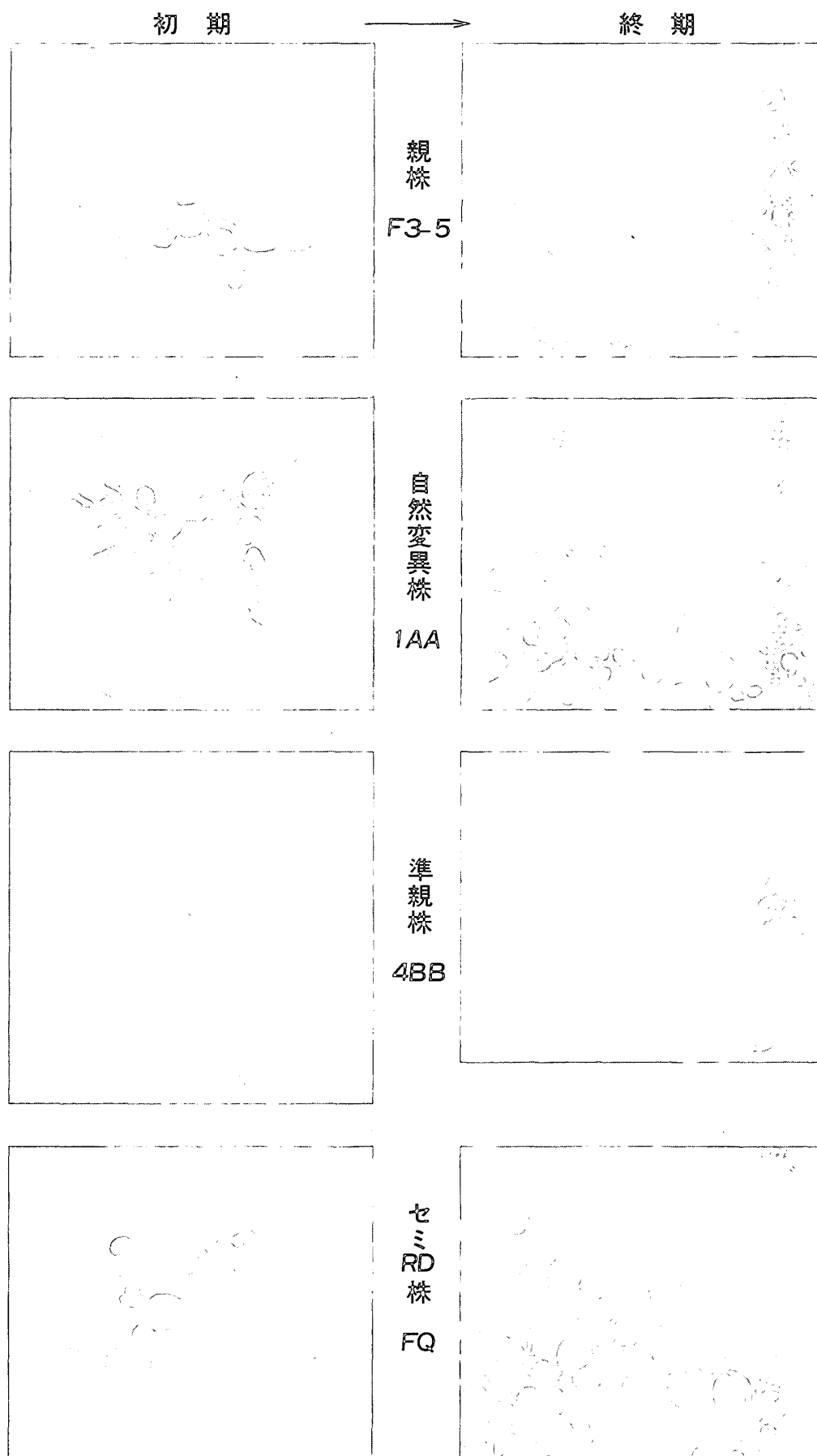


図 4 - 1 *K.fragilis* の単一細胞の増殖

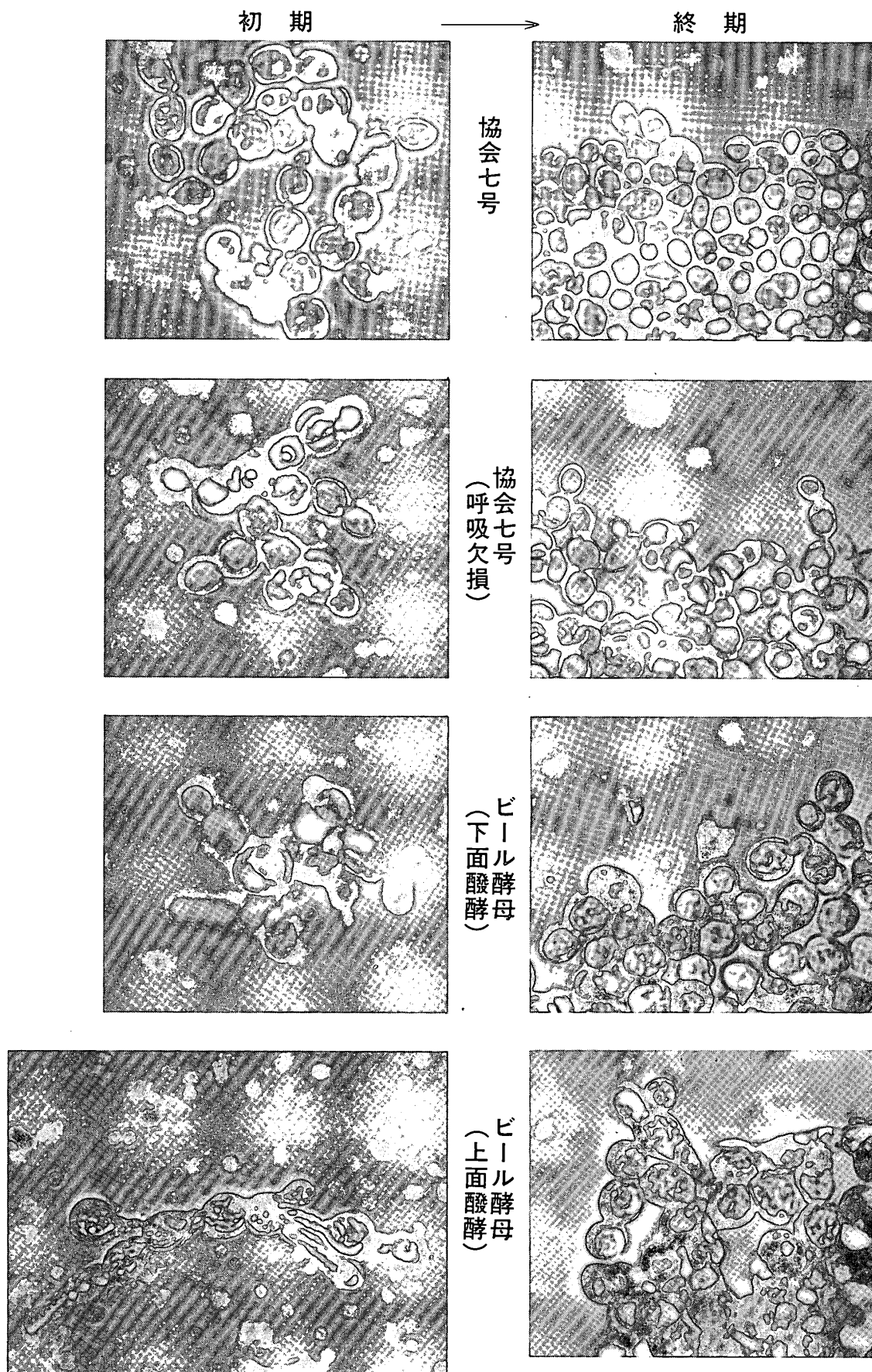
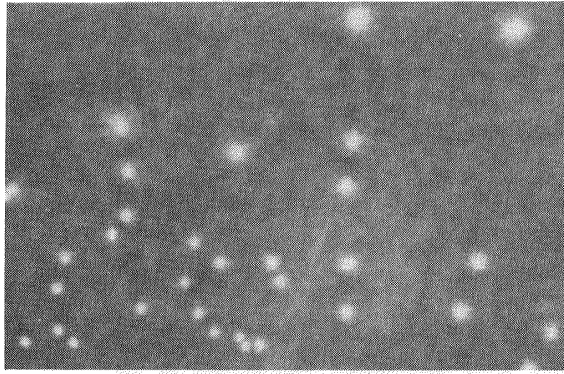


図 4 - 2 単一細胞の増殖

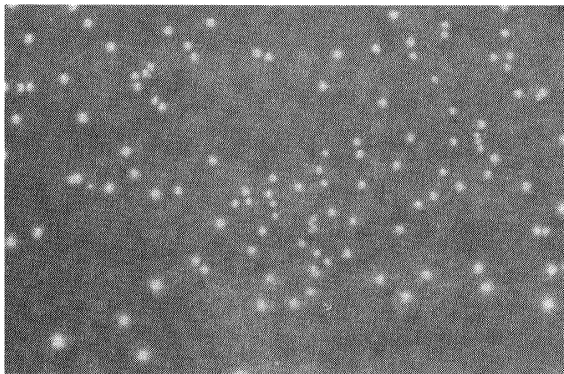
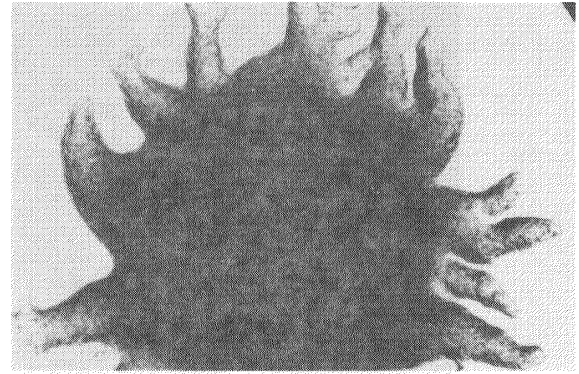
小コロニーの分布 (×20)



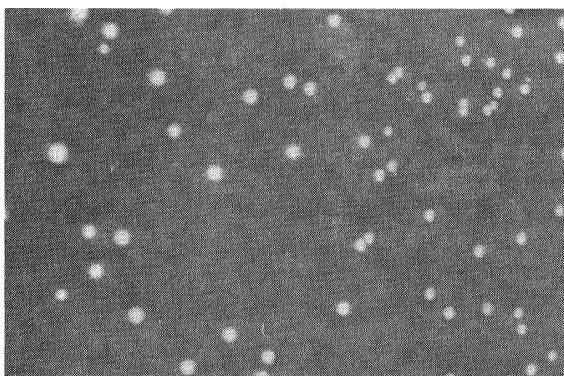
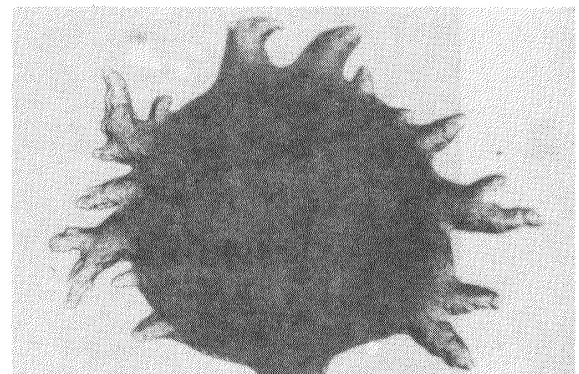
一つの小コロニーの拡大像 (×60)



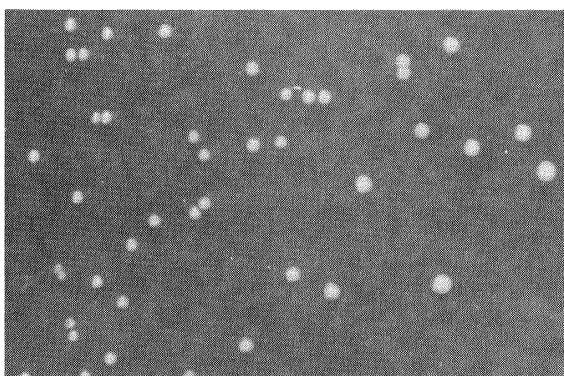
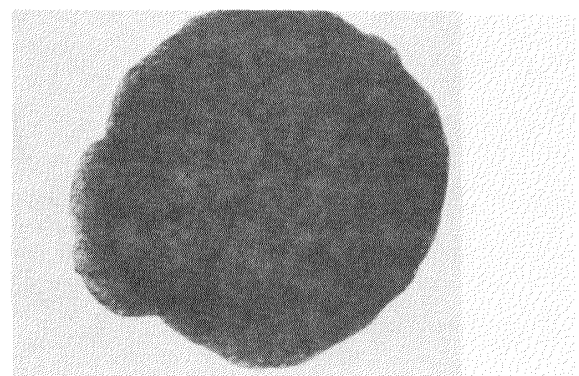
親株
F3-5



準親株
4BB



自然変異株
1AA



セミRD株
FQ

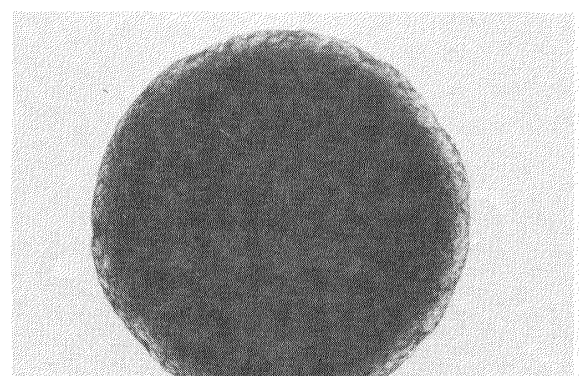


図5 *K.fragilis* のコロニーの分布と拡大像

要 約

- (1) *K. fragilis* の親株を B 培地寒天上に扁平培養を行ない、その分散コロニー中に星形コロニーと円形コロニーが得られた。
- (2) 星形コロニー及び円形コロニーを更に別々に継代培養を続けて、星形コロニー及び円形コロニーの各代表酵母を分離した。
- (3) 星形コロニーと円形コロニーの各代表酵母を調べた結果星形コロニー細胞は長伸形で親株の情円形と異なるので準親株変異とした。一方円形コロニー細胞はコロニーが円形で親株と完全に異なるが、且つ不定円形であるので自然変異株としてセミ RD 株（定円形コロニー）と区別した。
- (4) 自然変異株と準親株の単一細胞が麦汁懸滴中で増殖するのを顕微鏡で観察した結果前者は粗塊状をなすのに対し、後者は樹枝状である、セミ RD 株は凝塊状である。

B 培地寒天上での単一コロニーを三者についてみると親株 F 3—5 は星形であるが、1 AA は不定円形、4 BB は小形の星形、RD 株は完全な円形である。

(5) B 培地中での生長力是对糖収率は親株を 100 として準親株は 101 であり、自然変異株は 68 で劣り、セミ RD 株は 48 と最低である。これに対し協会酵母の親株は 323、RD 株は 270 でありビール酵母は上面下面何れも 270 程度である。

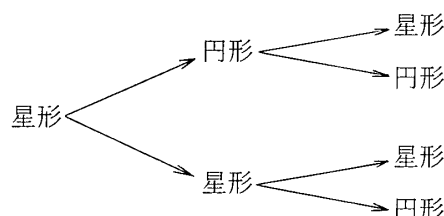
(6) 細胞の形態と醗酵能呼吸能の関係は RQ では親株と変異株は何れも 1.0 以下であるのに対して、準親株とセミ RD は 2.35 と 2.06 で可成り呼吸能が弱い。準親株がこの様に弱いのはその細胞が長伸形で野生型に変異したためと思われる。

協会 7 号酵母及びビール酵母は何れも RQ が 2.0 以上で Q_{O_2} と Q_{CO_2} の絶対値も可成り高い。

(7) 糖の醗酵性では *K. fragilis* 系は何れも乳糖とイヌリンを醗酵し協会酵母はマルトース、ガラクトースを醗酵しビール酵母はメリビオースを醗酵して Brl も S144 も特徴が明

確である。

(8) *K. fragilis* の場合 1 ケの細胞を継代培養でコロニーを作らせた場合、次のようにその形質の遺伝は変形頻度は少なくとも安定とは言えない。



これに対して、セミ RD 株は常に定円形で固定しているが、これは RD 誘発剤が細胞質因子に働くと同時にコロニー形成因子にも影響を及ぼしている結果と思われる。即ち細胞の増殖形態は細胞質遺伝子に関係がある。

本研究に当り、財団法人日本醸造協会研究室の吉田清氏の御協力を厚く感謝致します。

文 献

- (1) 秋山裕一：新酒造技術 醸協出版，p112 (1970)
- (2) BURKHOLDER, P.R., et al: Bulletin Torrey Botanical Club, No. 70, 372 (1943).
- (3) 笠原秀夫：聖徳栄養短大紀要 7, 13 (1976).
- (4) 笠原秀夫，衣鳩文恵：聖徳栄養短大紀要 11, 2 (1980).
- (5) OGUL LINDEGREN, G and LINDEGREN C.C.: J. Bact. 68, 391 (1954).
- (6) 吉川春寿他：ワールブルグ検圧計 (化学の領域増刊 3) 南江堂 (東京) (1954).